Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 2, Summer 2022, p. 227-238

Taxonomic Status of a Native Species of the Genus *Feltiella* Rübsaamen (Dip.: Cecidomyiidae) in Iran

M. Mollaei [1], H. Sadeghi Namaghi [2*]

Received: 19-01-2022 Revised: 10-04-2022 Accepted: 30-04-2022 Available Online: 21-09-2022	**How to cite this article:** Mollaei, M., & Sadeghi Namaghi, H. (2022). Taxonomic Status of a Native Species of the Genus *Feltiella* Rübsaamen (Dip.: Cecidomyiidae) in Iran. *Journal of Iranian Plant Protection Research 36*(2): 227-238. (In Persian with English abstract) **DOI:** 10.22067/JPP.2022.74687.1073

Introduction

The idea of sustainable agriculture has been considered recently due to increasing knowledge and concerns about the destructive effects of chemical pesticides. Biological control is an ecologically based pest management strategy with an important role in achieving sustainable agriculture. The success of this beneficial method closely depends on taxonomy, since accurate identification of pests and their natural enemies has a great importance in biocontrol project's achievement. The gall midges of the genus *Feltiella* are cosmopolitan species known as highly effective predators of tetranychid mites. Despite the high potential of *Feltiella* species as a biological control agent, *F. acarisuga* is the only species commercially available among eleven species of the genus. These predators are difficult to distinguish from each other because of the high similarity and low information about them. Comprehensive taxonomic studies are needed to identify promising species for the control of tetranychid mites. The aim of this study is to determine the status of the native *Feltiella* species in Iran emphasizing their molecular characteristics.

Materials and Methods

The native predatory gall midges larvae and pupae were collected periodically from the spider mites colony on various host plants (*Urtica dioica*, *Lactuca scariola* and *Rubus* sp.) in countrysides around Mashhad during 2018-2019 and maintained in a growth chamber (LD 16:8, 21±1°C, RH 75±5%) until emerging adults. Adults were preserved in ethanol for further analysis and identified morphologically based on male genitalia and other structures used in taxonomic treatments of the genus. The molecular genetic analysis was included DNA extraction using the Chelex 100 method, PCR amplification of the mitochondrial COI gene using the LCO/HCO universal primer pair, sequencing the gene, and matching the sequence with those of the related species using BLAST. Nucleotide divergence between sequences was estimated by Maximum Composite Likelihood model and by the Pairwise deletion method in MEGA-X software. Intra- and interspecific distances were calculated using ExcaliBAR software and their frequency distribution histogram was plotted using Excel software. The sequence data were analyzed through the neighbor-joining method using MEGA-X software. Evolutionary distances for the NJ method were computed by Kimura's two-parameter distances. The resulting tree was subjected to bootstrap analysis with 1000 pseudoreplications. The cecidomyiid genus *Endaphis* was employed as an outgroup taxon to construct the phylogenetic tree.

Results and Discussion

Based on morphological studies, specimens of the native acarivorous gall midges from various localities in Mashhad were identified as *Feltiella acarisuga* Vallot. In spite of the morphological result, the DNA sequence of

1- Postdoctoral Researcher in Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, and Iran National Science Fundation: INFS, Tehran, Iran
2- Professor in Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, and Responsible for the Postdoctoral Project in Iran National Science Fundation: INFS, Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: sadeghin@um.ac.ir)

the native species was relatively different from the corresponding sequence of *F. acarisuga* available in GenBank. The sequence match between the two species was 92.74% in maximum. The match with *F. acarivora* sequences was also low (maximum 91.84%). Whereas the BLAST results of the indigenous species sequence matched the corresponding sequence of *F. tetranychi* with more than 99% homology. Comparing the nucleotide differences between the specimens of the present species with *F. acarisuga* and *F. tetranychi* also showed that our *Feltiella* is a distinct species from *F. acarisuga*, despite of morphological identification. In the histogram of nucleotide distances, intra and inter specific distances in the COI gene overlapped with each other which were related to the nucleotide distances between individuals of *F. tetranychi* species in the gene bank and individuals of the species collected in the present study. Based on the neighbor-joining tree inferred from partial sequences of the COI gene related to *Feltiella* species, Iranian indigenous species and *F. tetranychi* species were in the same ancestor, while individuals of *F. acarisuga* species were in separate ancestors from the native gall midges. Therefore, according to our molecular studies, the specimens of the native gall midges of Mashhad were *F. tetranychi.* The possible interpretation for the difference between morphological and molecular identification results in this study is the difficulty of distinguishing the two species from each other, due to their great morphological similarity. *F. tetranychi* has been mentioned as a possible synonym for *F. acarisuga* so far, because of the high morphological resemblance. Personal correspondence with international experts revealed that there are two taxa named *F. tetranychi*, one named by Rubsaamen and introduced as one of the synonymous names of *F. acarisuga*, and the other named by Kieffer which is an unknown species and mentioned as a possible synonym of *F. acarisuga*. To prove or disprove the hypothesis whether *F. tetranychi* is synonymous with *F. acarisuga* or completely separate from it, it is necessary to study voucher specimens of *Feltiella* species. Studying further populations of the gall midges on various hosts around the world through sequencing more than one molecular marker is also needed.

Conclusion

In this study specimens of the native gall midges were identified as *Feltiella acarisuga* Vallot based on morphological identification, while molecular studies identified them as *F. tetranychi*. Since molecular identification is more accurate than morphological one, the present study can show how different the indigenous species is from the well-known commercial species *F. acarisuga*. The present native species probably has little ability to settle in artificial and manipulated environments despite of its activity in the nature of Mashhad. Its usage as a biological control agent for tetranychid mites requires further bio-ecological studies in the laboratory and its genetic comparison with known species in the world.

Keywords: Biological control, Gall midge, Molecular identification, Tetranychid mite

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۲۳۸-۲۲۷

موقعیت آرایه‌شناختی یک گونه‌ی بومی از جنس
Feltiella Rübsaamen (Dip.: Cecidomyiidae) در ایران

مائده ملائی[۱]- حسین صادقی نامقی[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰

چکیده

موفقیت برنامه‌های مهار زیستی آفات به آرایه‌شناسی و شناسایی دقیق آفت و دشمنان طبیعی آن بسیار وابسته است. پشه‌های گال‌زای جنس *Feltiella* Rübsaamen, 1910 از عوامل موثر مهار کنه‌های تارتن هستند، که علی‌رغم تنوع، گستردگی و توانایی مهار بالا تنها یک گونه از آن‌ها به‌صورت تجاری ثبت شده است. گونه‌های این جنس به دلیل داشتن هم‌نام‌های زیاد و پیچیده و نبود بررسی‌های جامع آرایه‌شناختی به سختی از یکدیگر قابل تفکیک می‌باشند. هدف از انجام این پژوهش، تعیین جایگاه آرایه‌بندی پشه *Feltiella* در ایران بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی آن است. جایگاه آرایه‌بندی این پشه با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود و عمدتا بر پایه ویژگی‌های دستگاه تناسلی حشرات نر و شناسایی مولکولی از طریق تعیین توالی زیرواحد یک ژن سازنده آنزیم سیتوکروم‌اکسیداز C و مقایسه آن با نمونه‌های موجود در بانک ژن انجام شد. در بررسی ریخت‌شناختی شکارگر جمع‌آوری‌شده از کلنی کنه‌های تارتن به *Feltiella acarisuga* Vallot تعیین هویت شد. این در حالی بود که در بررسی‌های مولکولی نمونه جمع‌آوری شده از مشهد شباهت بسیار کمتری به گونه‌ی معروف *F. acarisuga* نسبت به گونه‌ی منتسب به *F. tetranychi* داشت. به‌طوری‌که مقایسه اختلافات نوکلئوتیدی بین گونه‌ای نمونه‌های گونه‌ی بومی حاضر با نمونه‌های *F. acarisuga* و *F. tetranychi* موجود در بانک ژن و همچنین نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل اتصال- همسایگی نشان داد که نمونه‌های مشهد علی‌رغم شناسایی و تایید مورفولوژیکی به عنوان گونه *F. acarisuga*، احتمالا گونه‌ی *F. tetranychi* هستند، که به دلیل شباهت بسیار زیاد ریخت‌شناسی از آن به‌عنوان مترادف احتمالی *F. acarisuga* یاد می‌شود. با توجه به دقت بیشتر شناسایی مولکولی نسبت به ریخت‌شناختی، پژوهش حاضر تفاوت گونه‌ی مورد مطالعه با گونه‌ی معروف تجاری *F. acarisuga* را نشان می‌دهد. اثبات یا رد فرضیه مترادف بودن این دو گونه نیازمند مطالعه‌ی نمونه‌های تیپ گونه‌های *F. acarisuga* و *F. tetranychi* و بررسی مولکولی و ریخت‌شناختی جمعیت‌های مختلف دنیا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پشه گال‌زا، شناسایی مولکولی، کنه تارتن، مهار زیستی

مقدمه

در سال‌های اخیر با افزایش آگاهی و نگرانی نسبت به اثرات مخرب سموم شیمیایی بر روی سلامت انسان و محیط زیست، ایده کشاورزی پایدار مورد توجه قرارگرفته است. کشاورزی پایدار بر بهبود کشاورزی به گونه‌ای تاکید دارد، که علاوه بر تهیه غذای سالم و کافی بتواند یکپارچگی محیط زیست و منابع طبیعی را نیز برای نسل‌های آتی حفظ کند. لذا نیاز به توسعه روش‌هایی است که پایدار، مقاوم، قابل تحمل و در عین حال موثر باشند. این تفکر استفاده از عوامل مهار زیستی را توجیه می‌کند (Baker *et al.*, 2020; Saxena *et al.*, 2013; Singh, 2006). مهار پایدار آفات، نسبت به روش‌های مرسوم نیازمند رویکردی علمی‌تر و آگاهانه‌تر است. نخستین گام در مهار پایدار آفات تشخیص آفت برای دستیابی به اطلاعات مربوط به

۱ و ۲- به ترتیب پژوهشگر پسادکترا و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد ، ایران، مشهد و پژوهشگر پسادکترا و مسئول طرح پسادکترا، صندوق حمایت از پژوهشگران، ایران، تهران
(*- نویسنده مسئول: (Email: sadeghin@um.ac.ir
DOI: 10.22067/JPP.2022.74687.1073

زیست‌شناسی و مهار آن است. آرایه‌شناسی[1] شامل مطالعه نظریه، رویه و قوانین طبقه‌بندی موجودات زنده بر اساس شباهت‌ها و تفاوت‌های بین آن‌هاست. شناسایی دقیق حشرات آفت به مهارت متخصصین با تجربه علم آرایه‌شناسی نیاز دارد. اهمیت آرایه‌شناسی به حدی است که اشتباهات احتمالی در حوزه تشخیص آفات می‌تواند به شکست‌های گزاف در برنامه‌های مهار آفات منجر شود (Watson, 1997). مهار زیستی مدیریت آفات بر پایه بوم‌شناختی است، که نسبت به روش‌های شیمیایی و فیزیکی کنترل آفات پایدارتر و بادوام‌تر است و می‌تواند به‌عنوان یک سیستم جایگزین نقش مهمی در رسیدن به کشاورزی پایدار ایفا کند (Baker and Cook, 1974; Hoddle and Van Driesche, 2009). هسته مدیریت پایدار آفات را دو راهبرد مهار زیستی یعنی محافظت و بهره‌برداری از دشمنان طبیعی بومی و وارد کردن دشمنان طبیعی غیربومی تشکیل می‌دهند، که هر دوی آن‌ها نیازمند شناسایی آفت و دشمنان طبیعی آن می‌باشند (Watson, 1997). علی‌رغم مزایای متعدد عوامل مهار زیستی، تنها تعداد معدودی از این عوامل شناسایی و به صورت تجاری به ثبت رسیده‌اند و مهار زیستی به‌عنوان یک صنعت هنوز در ابتدای راه است. آینده مهار زیستی در گرو پیشرفت زیست فناوری در عرصه مطالعات پروتئومیک، ترنسکریپتومیک، متابولومیک و خصوصیات ژنومی عوامل مهار زیستی برای درک بهتر ساز وکارهای دخیل در کنترل پاتوژن‌های گیاهی است (Saxena *et al*., 2013; Sharma *et al*., 2013). موفقیت برنامه‌های مهار زیستی کلاسیک وابسته به تطبیق دقیق دشمن طبیعی با میزبان آن‌هاست و در این مسیر شناسایی صحیح هر دو گونه آفت و دشمن طبیعی بسیار حائز اهمیت است. از این رو می‌توان گفت مهار زیستی موفق وابستگی نزدیکی به آرایه‌شناسی دارد (Rosen, Barratt *et al*., 2018; Watson, 19971986;).

در میان گروه‌های آرایه‌شناختی که به‌عنوان عامل مهار زیستی مورد توجه قرارگرفته‌اند، پشه‌های گال‌زای جنس *Feltiella* موجود در کلنی کنه‌های گیاه‌خوار قریب به دویست سال است که توجه متخصصین را به خود جلب کرده‌اند (Fedotova and Kozlova, 2019). جنس *Feltiella* پیش تر تحت نام‌های مختلفی شناخته و توصیف می‌شد، که هم‌اکنون همگی تحت یک نام شناخته می‌شوند. این جنس در سال ۱۹۹۵ توسط گاگنه مورد بازبینی و نام‌گذاری مجدد قرار گرفت و تعداد نام‌های آن از ۲۴ به ۸ عدد کاهش یافت (Abe *et al*., 2011). طبق کتاب فهرست Cecidomyiidae جنس *Feltiella* مشتمل بر یازده گونه با پراکنش جهانی است، که لاروهای همه گونه‌های آن به کنه‌های تترانیکید حمله می‌کنند (Gagné and Jaschhof, 2021). در این میان گونه‌ی *F. acarisuga* مشتمل بر بیش از ده نام مترادف است که در سراسر جهان، به‌جز نواحی نئوتروپیکال پراکنده است. *F acarivora* از اندونزی، ژاپن و استرالیا، *F. curtistylus* از برزیل، آرژانتین و فلوریدا، *F. insularis* تحت نام‌های مختلف از نواحی مختلف آمریکای شمالی و جنوبی، *F. kanchanjungaensis* از شرق هند، *F. ligulata* از آمریکای جنوبی، *F. luboviae* از شمال غربی روسیه، *F. occidentalis* از کالیفرنیا و ژاپن، *F. pini* تحت نام‌های مختلف از آمریکای شمالی و مرکزی و استرالیا، *F. reducta* ازآمریکا و *F. tetranychi* از بخش‌های مختلف اروپا، ترکیه و جنوب روسیه گزارش شده‌است. در میان گونه‌های جنس *Feltiella*، گونه‌ی *F. acarisuga* با بیش‌ترین میزان پراکنش جهانی و قدرت شکارگری بسیار بالا به عنوان شکارگر بسیار موثر کنه‌های جنس *Tetranychus* در بسیاری از کشورها شناخته شده‌است (Ganaha- Fedotova and Kozlova, 2019; Kikumura *et al*., 2012). این گونه در حال حاضر توسط شرکت‌های متعددی در سراسر دنیا تولید می‌شود و موفقیت آن در کنترل کنه‌های تارتن از نقاط مختلف جهان گزارش شده‌است (Opit *et al*., 1997; Sharaf, 1984; Gillespie *et al*., 1998; Wardlow and Jobin, 1990). علی‌رغم توانایی بالای گونه‌های جنس *Feltiella* به‌عنوان عامل مهار زیستی، به دلیل مطالعه‌ی کمی که روی این حشرات کنه‌خوار به‌ویژه در حوزه تشخیص آن‌ها صورت گرفته، اطلاعات در مورد این حشرات مفید پراکنده و اندک است. از طرفی به دلیل داشتن هم‌نام‌های زیاد و پیچیده گونه‌های این جنس (Gagné and Jaschhof, 2021Gagné, 1995;) و نبود یک مطالعه‌ی جامع آرایه‌شناختی درباره آن‌ها به سختی از یکدیگر قابل شناسایی و تفکیک می‌باشند. به‌طوری‌که در بسیاری از مقالات مربوط به زیست‌شناسی، این گونه‌ها تنها تحت عنوان کلی *Feltiella* sp. گزارش شده‌اند (Gagné, 1995). تنها توصیف کامل در دسترس از این جنس مربوط به دو گونه از میان یازده گونه‌ی جنس *Feltiella* است (Ganaha-Kikumura *et al*., 2012; Abe *et al*., 2011;). ازاین‌رو مطالعات بیش‌تر برای گسترش دانش آرایه‌شناختی و زیست‌شناسی این حشرات کنه‌خوار و به دنبال آن تعیین گونه‌های امیدبخش برای مهار کنه‌های تارتن ضروری به نظر می‌رسد (Fedotova and Kozlova, 2019). کشف یک گونه‌ی جدید از *Feltiella* در ایران به استفاده از این دشمن طبیعی در مدیریت آفات کمک می‌کند. بر اساس منابع موجود (Abe *et al*., 2011; Ganaha-Kikumura *et al*., Fedotova and Kozlova, 2019; 2012) شناسایی و تفکیک گونه‌های *Feltiella* از یکدیگر از طریق یک سری ویژگی‌های ظاهری نظیر وضعیت بندهای شاخک، بال و رگ‌بال‌ها، اندازه ران، ساق و بندهای پنجه، پالپ‌ها و عمدتا شکل‌شناسی دستگاه تناسلی خارجی حشرات نر صورت می‌گیرد. ازآن‌جایی‌که تفکیک گونه‌ها از روی مشخصات ظاهری حشرات ماده

1- taxonomy

بسیار مشکل است، گاها به‌دلیل عدم دسترسی به حشرات نر گونه‌ها ناشناخته باقی‌مانده‌اند (Abe *et al.*, 2011). ضمن این‌که تکیه بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی جنیتالیا الزاما همیشه روش تشخیصی واضحی نیست (Fedotova and Kozlova, 2019). در بسیاری از گروه‌های آرایه‌شناختی شناسایی عوامل بالقوه مهار زیستی بر پایه زمینه‌های ریخت‌شناسی به تنهایی کافی نیست و لازم است تا تفکیک گونه‌ها از طریق روش‌های مولکولی نیز صورت گیرد (Barratt *et al.*, 2018). در تشخیص هر چه دقیق‌تر عوامل مهار زیستی نیز استفاده از روش‌های مولکولی در کنار ویژگی‌های ریخت‌سنجی بسیار اهمیت دارد، تا جایی که ترکیب آرایه‌شناسی سنتی و روش‌های مولکولی جزء جدایی‌ناپذیر فعالیت‌های مهار زیستی در آینده خواهد بود (Barratt *et al.*, 2018). DNA بارکدینگ به‌عنوان ابزاری موثر در شناسایی و تشخیص گونه‌ها، مکمل خوبی برای روش‌های ریخت‌شناختی است. این روش همچنین در شناسایی نمونه‌های ناقص ریخت‌شناسی، فرم‌های نابالغ حشرات و گونه‌های دارای چندشکلی بسیار کارآمد است (Armstrong and Ball, 2005). قطعه COI زیرواحد یک ژن سازنده آنزیم سیتوکروم‌اکسیداز C است، که به‌عنوان یک بارکد ژنتیکی در آرایه‌شناسی طیف وسیعی از گونه‌های جانوری از جمله گونه‌های .*Feltiella* spp مطرح و مورد استفاده است (Abe *et al.*, 2011؛ Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012). در زمینه آرایه‌شناسی گونه‌های .*Feltiella spp*، علی‌رغم توانایی فوق‌العاده‌شان در مهار زیستی، مطالعات اندکی صورت گرفته‌است. به‌طوری‌که فقط دو مورد توصیف کامل از جنس *Feltiella* در دسترس است و تنها تعداد معدودی توالی از این جنس در بانک ژن به‌ثبت رسیده‌است. در ایران تا کنون از جنس *Feltiella* دو گونه *F. acarivora* و *F. acarisuga* گزارش شده است (Honarmand *et al.*, 2015). هدف از پژوهش حاضر تعیین وضعیت گونه‌ی بومی *Feltiella acarisuga* در ایران بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی آن است. اطمینان از هویت این عامل بالقوه بیوکنترل می‌تواند نقش مهمی در برنامه‌های آتی مهار زیستی کنه تارتن با تکیه بر ذخایر بومی و سرمایه‌های طبیعی کشور داشته باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و شناسایی پشه گالزای شکارگر

نمونه‌برداری طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ (عمدتا در ماه‌های اردیبهشت-شهریور) با جمع‌آوری برگ گیاهان گزنه *Urtica dioica*، کاهوی وحشی *Lactuca scariola* و تمشک .*Rubus* sp آلوده به کنه تارتن دونقطه‌ای از مناطق ییلاقی توابع شهرستان طرقبه-شاندیز انجام شد. برگ‌های آلوده پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقات کنه‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد، برای یافتن لارو و شفیره پشه گال‌زا، زیر استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند و حشرات نابالغ همراه با برگ آلوده به کنه به پتری‌دیش‌های حاوی پد مرطوب منتقل شدند. پتری‌دیش‌ها پس از انتقال به اتاقک رشد (با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۱±۲۱ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۷۵ درصد) به‌طور روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و حشرات کامل ظاهر شده برای شناسایی و پرورش جمع‌آوری شدند. نمونه‌های حشرات کامل برای بررسی ریخت‌شناسی در اتانول ۷۰ درصد و برای بررسی مولکولی در اتانول خالص نگهداری شدند. برای شناسایی ریخت‌شناختی پس از شفاف‌سازی نمونه‌ها با استفاده از هیدروکسیدپتاسیم ده درصد، هر نمونه در مخلوط هویر به صورت اسلاید میکروسکوپی دایمی روی لام تثبیت شد. نمونه ها با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود (Lee *et al.*, 2004 Harris, 1966 ;) شناسایی و برای تایید نام علمی گونه به نزد دکتر اسکوراوا در جمهوری چک ارسال شد. نمونه‌های مستند (voucher) در گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و تعدادی نیز در مجموعه آزمایشگاه شخصی دکتراسکوراوا نگهداری می‌شوند.

استخراج DNA

برای شناسایی مولکولی، از نمونه های نگهداری شده در اتانول ۹۶ درصد و دمای ۲۰- درجه سلسیوس استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از نمونه های کامل با استفاده از روش چلکس ۱۰۰ انجام شد. بعد از تبخیر کامل اتانول، ۵-۷ عدد حشره کامل در حضور نیتروژن مایع، در یک میکروتیوب حاوی ۴۰ میکرولیتر بافر استخراج (چلکس ۵٪) و ۴ میکرولیتر پروتئیناز پتاسیم کاملا ساییده و له شد. مخلوط هم‌گن به‌دست‌آمده به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم ۶۰ درجه و سپس برای غیرفعال کردن آنزیم به مدت ۸ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ نمونه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه، محلول رویی برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز برداشته شد (Muraji *et al.*, 2004; Sayed *et al.*, 2013).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تعیین توالی

برای تکثیر بخشی از ژن COI از ترکیب دو آغازگر LCO (5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′) به‌عنوان آغازگر رفت و HCO (5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′) به‌عنوان آغازگر برگشت استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (پارس توس، مشهد)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، ۳ میکرولیتر DNA الگو و

۷/۵ میکرولیتر آب مقطر، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد (Folmer *et al.*, 1994). دمای بهینه اتصال (annealing) با انجام PCR گرادیان مشخص شد. برنامه دمایی واکنش PCR به صورت واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه (شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و در آخر گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه بود. پس از اتمام واکنش PCR برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر ۴ میکرولیتر از محصول PCR در چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت پنج محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت بایونیر کره جنوبی (Bioneer Corporation, Daejeon, South Korea) ارسال شد. توالی‌یابی به صورت دوطرفه از سمت آغازگر رفت و برگشت و با استفاده از همان آغازگرهای واکنش PCR انجام شد.

تحلیل داده‌های مولکولی

کروماتوگرام توالی‌های به‌دست‌آمده به کمک نرم‌افزار DNA Baser (نسخه ۳,۵,۴) مقایسه و ویرایش شدند و سپس هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها توسط نرم‌افزار MEGA-X (نسخه ۱۰,۱,۶) انجام شد. نهایتا توالی ها با سایر توالی های COI موجود در بانک ژن (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) توسط ابزار BLASTn مقایسه و همسانی آن‌ها با یکدیگر تایید شد. تخمین میزان واگرایی نوکلئوتیدها با مدل Maximum Composite Likelihood model و به روش Pairwise deletion در نرم‌افزار MEGA X انجام شد. محاسبه فواصل نوکلئوتیدی با استفاده از مدل جایگزینی نوکلئوتیدی کیمورا (Kimura, 1980) انجام شد. فواصل درون و بین گونه‌ای با استفاده از نرم‌افزار ExcaliBAR محاسبه (Aliabadian *et al.*, 2014) و هیستوگرام توزیع فراوانی آن ها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید. تحلیل خوشه‌بندی[1] با روش اتصال همسایگی[2] در نرم‌افزار MEGA X و براساس مدل جایگزینی نوکلئوتیدی کیمورا انجام گرفت. در رسم درخت تبارشناسی به‌منظور مقایسه موقعیت فیلوژنتیک نمونه‌های مورد بررسی، کلیه توالی‌های مربوط به جنس *Feltiella* ی موجود در بانک ژن (شامل هشت توالی از گونه‌ی *F. acarisuga*، دو توالی از *F. acarivora* و یک توالی از *F. tetranychi*) دریافت شد و از جنس *Endaphis* به‌عنوان گروه خارجی استفاده گردید (جدول ۱). برای تخمین میزان اعتبار گره‌ها[3] از آزمون بوت‌استرپ[4] با هزار تکرار استفاده شد.

نتیجه‌گیری و بحث

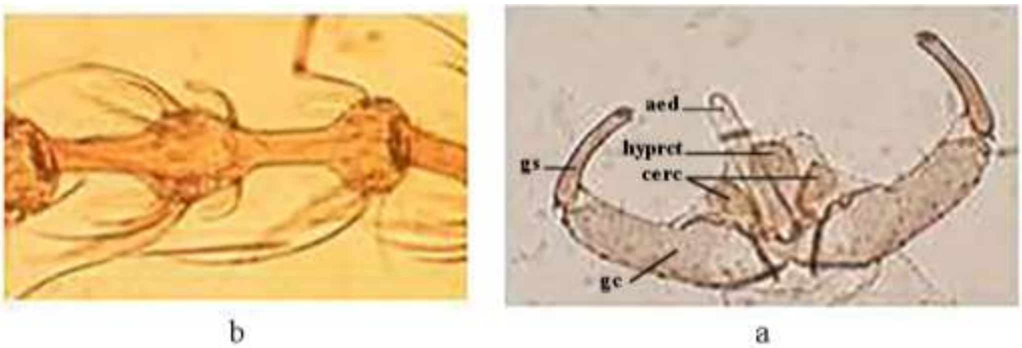
در این پژوهش، بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی و با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود، شکارگر جمع‌آوری‌شده از کلنی کنه‌های تارتن به نام *Feltiella acarisuga* Vallot تعیین هویت شد، که برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن به این صورت است: حشرات کامل با بدنی به رنگ خاکستری تیره و شکم مایل به صورتی، دارای جثه‌ای کوچک به طول ۱/۵ –۱ میلی‌متر هستند. پالپ‌ها ۴ بندی، کوتاه‌تر از طول و عرض سر و شاخک‌ها ۱۴ بندی با شکل فلاژلومرهای[5] انتهایی متغیر می‌باشند. شکل فلاژلومرها در افراد نر و ماده متفاوت، هر فلاژلومر در نرها با دو گره، گره قاعده‌ای و انتهایی به ترتیب پوشیده از یک و دو ردیف موهای بلند حلقوی و در حشرات ماده استوانه‌ای شکل، با گردن کوتاه و بدون مو می‌باشد. بال‌ها نسبتا پهن، به طول تقریبی ۱/۰۸ میلی‌متر، رگبال شعاعی پنج (R_5) مستقیم، در نزدیک نوک بال به رگبال کناری (C) متصل و رگبال شعاعی یک (R_1) در نیمه قاعده‌ای به رگبال کناری پیوسته‌است. اولین بند پنجه بدون خار، در نرها ناخن‌های پنجه پاهای جلوی دندانه‌دار و ناخن‌های پاهای میانی و عقبی ساده است. دستگاه تناسلی خارجی حشرات نر با هیپوپروکت‌های کامل و بلندتر از سرسی‌ها که به سمت انتها به تدریج باریک می‌شوند. ایدیاگوس[6] بلندتر از هیپوپروکت[7]، پهن، کشیده و در انتها گرد است (شکل ۱).

جهت تایید شناسایی مورفولوژیک انجام‌شده، پس از تکثیر موفقیت‌آمیز نشانگر ژنتیکی COI، کلیه توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه داده‌های بانک ژن به‌وسیله جستجوی بلاست انطباق یافتند. بیشترین میزان شباهت توالی‌های مورد بررسی با توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن (حدود ۱۰۰ درصد)، با دو گونه‌ی طبقه‌بندی‌نشده از Cecidomyiidae بود که از منطقه اونتاریوی کانادا گزارش شده بودند. از پنج توالی بررسی‌شده نتیجه بلاست همه توالی‌ها با درجه شباهتی بین ۹۹/۲۰ تا ۹۹/۸۴ درصد با توالی مربوط به گونه‌ی *F. tetranychi* (متعلق به منطقه‌ای در جنوب شرقی انگلستان) منطبق شدند.

1- Clustering analysis
2- Neighbor Joining
3- Nodal support
4- Bootstrap
5- flagellomere
6- aedeagus
7- hypoproct

جدول ۱- نمونه‌های استفاده‌شده از بانک ژن برای تجزیه و تحلیل فیلوژنی
Table 1- Gene Bank utilized samples for phylogenetic analysis

گونه **Species**	منبع د ان آ **DNA source**	شماره دسترسی **Accession number**
F. tetranychi	Dorchin *et al.*, 2019	**MN191294.1**
F. acarisuga	Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012	**AB698985.1**
F. acarisuga	Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012	**AB698981.1**
F. acarisuga	Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012	**AB698978.1**
F. acarisuga	Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012	**AB698983.1**
F. acarisuga	Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012	**AB698979.1**
F. acarisuga	Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012	**AB698980.1**
F. acarisuga	Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012	**AB698982.1**
F. acarisuga	Dorchin *et al.*, 2019	**MN191293**
F. acarivora	Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012	**AB698995.1**
F. acarivora	Ganaha-Kikumura *et al.*, 2012	**AB699003.1**
Endaphis fugitive	Gariepy and Messing, 2012	**HQ599568.1**



شکل ۱- دستگاه تناسلی خارجی (a) و فلاژلومر حشره نر (b) گونه‌ی *Feltiella* ی مشهد (شکل‌ها اصلی)

(aed، hyprct، cerc، gs و gc به‌ترتیب ایدیاگوس، هیپوپروکت، سرسی‌ها، گونواستایلوس و گونوکوکسیت هستند).

Figure 1- Male genitalia and flagellomere of *Feltiella* species of Mashhad

(aed, hyprct, cerc, gs and gc are aedeagus, hypoproct, cerci, gonostylus and gonocoxite respectively).

این در حالی بود که میزان شباهت کلیه توالی‌های COI مورد بررسی در این پژوهش با توالی‌های مشابه *F. acarisuga* ی موجود در بانک ژن حداکثر ۹۲/۷۴ درصد و با توالی‌های مشابه *F. acarivora* حداکثر ۹۱/۸۴ درصد بود (جدول ۲). این سطح پایین تشابه بین توالی‌های دو گونه‌ی اخیر با توالی گونه‌ی مورد بررسی می‌تواند نشان‌دهنده‌ی متمایز بودن گونه‌ی بومی حاضر از آن‌ها باشد.

جهت محاسبه بارکد گپ[1] توالی‌های گونه‌های مختلف *Feltiella* spp. از بانک ژن استخراج و به توالی‌های مطالعه ی حاضر اضافه شد. فواصل نوکلئوتیدی بین گونه‌های *Feltiella* spp. (شامل گونه‌های توالی‌یابی‌شده در مطالعه‌ی حاضر و گونه‌های موجود در بانک ژن) براساس مدل جایگزینی نوکلئوتیدی کیمورا از صفر تا ۰/۱۰۴ متغیر بود و میانگین فواصل نوکلئوتیدی بین توالی گونه‌های مورد نظر ۰/۰۸۰ محاسبه شد. فواصل نوکلئوتیدی بین نمونه‌های بومی *Feltiella* (همچنین نمونه‌های گونه‌ی *F. tetranychi*) و نمونه‌های گونه‌ی *F. acarisuga* نسبتا زیاد بود (۰/۰۷۵۳ تا ۰/۰۹۱۱)، در حالی که در مقایسه بین نمونه‌های بومی و نمونه‌های گونه‌ی *F. tetranychi* اختلافات نوکلئوتیدی بسیار کمتر (۰/۰۰۱۵ تا ۰/۰۰۳۱) مشاهده شد. علاوه بر این، اختلاف نوکلئوتیدی گونه‌ی *F. acarivora* با هر سه گونه‌ی نام‌برده نسبتاً زیاد و تقریباً مساوی ارزیابی شد، چنان‌که با نمونه‌های گونه‌ی بومی مورد بررسی بین ۰/۰۸۷۴ تا ۰/۰۹۳۰ (میانگین ۰/۰۹۰۱) و با نمونه‌های گونه‌ی *F. tetranychi* بین ۰/۰۸۸۸ تا ۰/۰۹۴۰ (میانگین ۰/۰۹۱۳) و با گونه‌ی شناخته‌شده *F. acarisuga*، بین ۰/۰۸۸۸ تا ۰/۱۰۳۹ (میانگین ۰/۰۹۳۵) تعیین گردید.

پس از به‌دست آوردن فواصل دو به دو بین همه توالی‌های موجود، هیستوگرام فواصل نوکلئوتیدی بین و درون گونه‌ای بر اساس فراوانی آن‌ها رسم شد (شکل ۲). چنان‌که در شکل مشخص است، فواصل بین و درون‌گونه‌ای در ژن COI نسبت به‌یک‌دیگر هم‌پوشانی دارند. با بررسی قسمت‌های هم‌پوشان مشخص شد که این همپوشانی‌ها مربوط به فواصل نوکلئوتیدی بین افراد گونه‌ی *F.*

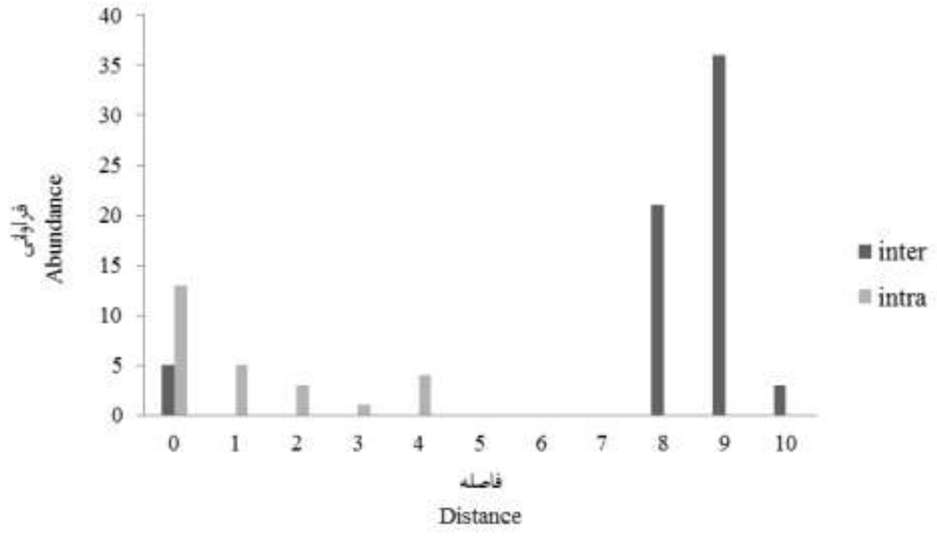
1- Barcode gap

tetranychi موجود در بانک ژن و افراد گونه‌ی جمع‌آوری شده در مطالعـه‌ی حاضر هستند که از نظر ریخت‌شناختی به عنوان گونـه‌ی *F. acarisuga* در نظر گرفته شدند.

جدول ۲- درصد شباهت و میزان پوشش توالی‌های مورد بررسی با توالی‌های بانک ژن

Table 2- Similarity and coverage between our sequences and those from the NCBI GenBank database

شماره دسترسی نمونه **Specimen accession number**	تاکسون مربوطه **Corresponding Taxon**	شماره دسترسی بهترین برخورد بلاست بانک ژن **Best Genbank BLAST hit Accession number**	شباهت **Similarity**	میزان پوشش **Coverage (bp)**
OL873569 *Feltiella sp.*- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MG120911	99.82%	582
	F. tetranychi	MN191294	99.66%	629
	F. acarisuga	AB698981	92.28%	814
OL873570 *Feltiella sp.*- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MF698911	100.00%	588
	F. tetranychi	MN191294	99.84%	629
	F. acarisuga	AB698985	92.74%	814
	F. acarivora	AB698995.1	91.84%	814
OL873571 *Feltiella sp.*- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MG120911	99.83%	582
	F. tetranychi	MN191294	99.66%	629
	F. acarisuga	AB698985	92.60%	814
	F. acarivora	AB698995	91.52%	814
OL873572 *Feltiella sp.*- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MG120911	99.83%	582
	F. tetranychi	MN191294	99.20%	629
	F. acarisuga	AB698985	92.58%	814
	F. acarivora	AB698995	91.52%	814
OL873573 *Feltiella sp.*- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MG120911	99.83%	582
	F. tetranychi	MN191294	99.67%	629
	F. acarisuga	AB698985	92.64%	814
	F. acarivora	AB698995	91.57%	814



شکل ۲- هیستوگرام توزیع فواصل نوکلئوتیدی بین و درون‌گونه‌ای در گونه‌های مختلف جنس *Feltiella* برپایه‌ی ژن COI

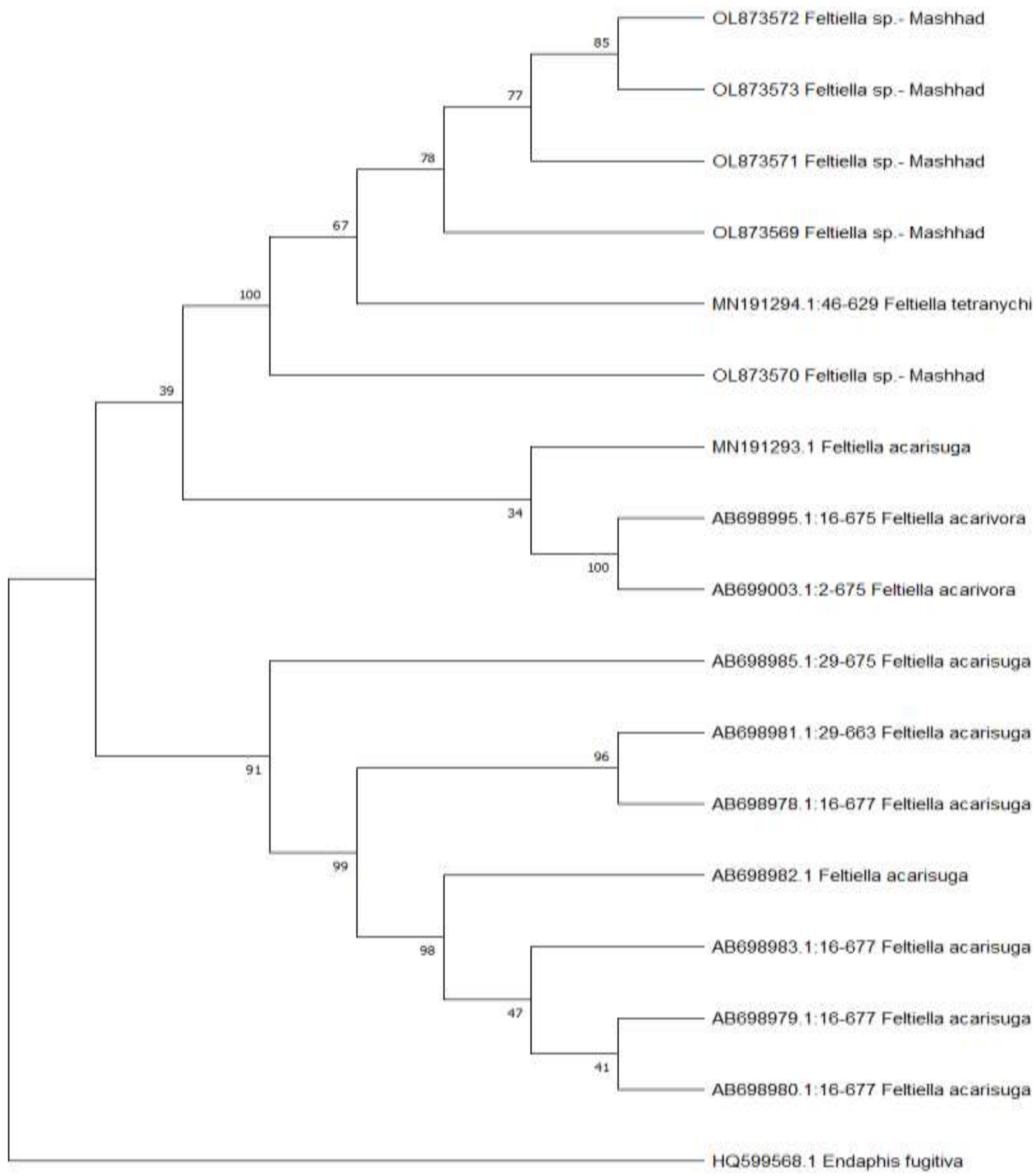
ستون‌های خاکستری فواصل درون‌گونه‌ای و ستون‌های سیاه فواصل بین‌گونه‌ای را نشان می‌دهند.

Figure 2- Histogram of the distribution of Inter and intra specific distances in different species of the genus *Feltiella* based on the COI gene

Gray columns indicate interspecific distances and black columns represent interspecific distances.

درخت تبارشناسی (شکل ۳) حاصل از گونه‌هـای مختلـف جـنس *Feltiella* نشان داد که افراد گونه جمع‌آوری شده از ایران و گونـه‌ی *F. tetranychi* در یک نیاک و افراد گونـه‌ی *F. acarisuga* نیـز در نیاکی جدا قرار دارند.

باتوجه به اختلافات نوکلئوتیدی نسبتاً زیاد بین نمونه‌های گونه‌ی *F. acarisuga* و نمونه‌های این مطالعه و نیز قرار گرفتن نمونه‌هـای گونه‌ی *F. acarisuga* در نیاکی مجزا از نیاک مربوط به نمونـه‌هـای مطالعه‌ی اخیر (شکل ۳)، می‌توان نتیجه گرفت که نمونـه‌هـای گونـه جمع‌آوری شده از مشهد علی‌رغم تشخیص ریخت‌شناختی احتمالاً *F. acarisuga* نیستند.



شکل ۳- درخت اتصال-همسایگی استنباط شده از توالی‌های قسمتی از ژن COI مربوط به‌گونه‌های *Feltiella*

درصد بوت‌استرپ (۱۰۰۰ تکرار) در نزدیک هر شاخه نشان داده شده است (مقادیر زیر ۵۰ درصد حذف شده‌اند). خط مقیاس نشان‌دهنده فواصل براساس مدل جایگزینی کیمورا است. نمونه‌های مورد آزمایش با نام *Feltiella sp.* Mashhad مشخص شده‌اند.

Figure 3- Neighbor-joining tree inferred from partial sequences of the COI gene related to *Feltiella* species

از سوی دیگر، باتوجه به میزان اختلافات نوکلئوتیدی کم بین نمونه‌های گونه‌ی *Feltiella* ی مطالعه‌ی حاضر و نمونه‌های گونه‌ی *F. tetranychi* موجود در بانک ژن، همپوشانی فواصل نوکلئوتیدی بین افراد گونه‌ی *Feltiella* ی ایران و افراد گونه‌ی *F. tetranychi* بانک ژن و همچنین نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل اتصال-همسایگی، می‌توان نتیجه گرفت که نمونه‌های بومی مورد بررسی، احتمالاً گونه‌ی *F. tetranychi* هستند. تفسیر محتمل آن است که این گونه‌ها به دلیل شباهت ریخت‌شناسی بسیار زیاد به راحتی از یک‌دیگر قابل تفکیک نیستند. با این حال اظهار نظر در مورد هویّت واقعی نمونه‌های ایرانی نیازمند مقایسه‌ی ریخت‌شناختی این نمونه‌ها با گونه‌ی *F. tetranychi* است. به‌علاوه از آن‌جایی که روش‌های مولکولی برای شناسایی و تفکیک گونه‌هایی که از نظر ریخت‌شناسی مرموز یا غیرقابل تمیز می‌باشند، ابزاری سودمند هستند، پیشنهاد می شود از ژن‌های بیشتری برای بررسی‌های مولکولی تکمیلی استفاده شود (Hewitt *et al.*, 1991).

در تحقیق حاضر بعد از آشکار شدن تفاوت نتایج تشخیص مولکولی و ریخت‌شناختی نمونه‌هایی طی دفعات برای شناسایی مجدد به نزد دکتر اسکوراوا در جمهوری چک ارسال شد، که باز هم به عنوان *F. acarisuga* تایید شد. نهایتا طی مکاتباتی که با متخصصین صاحب نظر بین‌المللی صورت گرفت مشخص شد که *F. tetranychi* به لحاظ ریخت‌شناسی به *F. acarisuga* بسیار شبیه است، به‌طوری که برخی تاکسونومیست‌ها این دو گونه را هم‌نام می‌دانند. گاگنه نیز در فهرست Cecidomyiidae خود اعلام کرده که گونه *F. tetranychi* احتمالا با *F. acarisuga* هم‌نام است (Gagné and Jaschhof, 2021). در این فهرست دو فرد با نام *F. tetranychi* وجود دارد که یکی مشخصا به‌عنوان مترادف *F. acarisuga* و دیگری به‌عنوان گونه‌ای مجزا طبقه‌بندی می‌شود. گونه‌ی مجزای *F. tetranychi* برای اولین بار از جنوب روسیه یافت‌شد و در سال ۱۹۰۸ توسط Kieffer نام‌گذاری شد. *F. tetranychi* Kieffer گونه‌ای است که به درستی شناخته نشده و جز محل پراکنش اطلاعات چندانی از آن در دسترس نیست. لازم به ذکر است که گاگنه در سال ۱۹۹۵ از این گونه به‌عنوان گونه هم‌نام *F. acarisuga* یاد کرده است، اما بعدها در فهرست خود آن را به‌عنوان یک گونه‌ی کاملا مجزا معرفی کرده است. گونه‌ی دیگر *F. tetranychi* در سال ۱۹۱۰ توسط Rubsaamen نام‌گذاری شده‌است که از نظر ریخت‌شناسی کاملا به *F. acarisuga* شبیه است و گاگنه در کاتالوگ خود (Gagné and Jaschhof, 2021) آن را مترادف *F. acarisuga* می‌داند (Skuhravá and Skuhravý, 2020). اثبات یا رد این فرضیه که آیا *F. tetranychi* Kieffer گونه‌ای هم‌نام با *F. acarisuga* و یا کاملا مجزا از آن است، مستلزم نمونه‌برداری از جمعیت‌های مختلف پشه گال‌زا در میزبان‌های متنوع از سراسر جهان و انجام بررسی‌های مولکولی بیشتر با توالی‌یابی بیش از یک نشان‌گر مولکولی است. به‌علاوه در حل این معما لزوم بررسی‌های مولکولی نمونه‌های تیپ گونه‌های جنس *Feltiella* موجود در موزه‌های محل نگهداری آن‌ها در کشورهای امریکا، فلسطین اشغالی، انگلستان و آلمان مورد تاکید است (مکاتبات شخصی با پروفسور گاگنه در امریکا، پروفسور هریس در انگلستان، دکتر منگوال در آلمان و دکتر دورخین در دانشگاه تل‌آویو). آن‌چه مسلم است این است که شناسایی مولکولی نسبت به مطالعات ریخت‌شناختی از دقت بالاتری برخوردار بوده و مکمل آن است، که می‌تواند نشان دهد گونه‌ی مورد بررسی چقدر با گونه‌ی شناخته‌شده *F. acarisuga* که به‌عنوان شکارگر موفق کنه‌های تارتن در سراسر دنیا شناخته می‌شود، تفاوت دارد. گونه‌ی بومی حاضر احتمالا توانایی کمی برای استقرار در محیط های مصنوعی و دست‌کاری‌شده را دارد و علی‌رغم فعالیت در طبیعت شهرستان مشهد، استفاده از آن به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک کنه های تارتن نیازمند بررسی‌های بیواکولوژیک بیشتر در شرایط آزمایشگاه و مقایسه ی ژنتیکی آن با گونه های شناخته شده در دنیا است.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب و با حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (طرح شماره ۹۵۰۰۸۰۷۷) انجام شده‌است. بدینوسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور و دانشگاه فردوسی مشهد که امکانات مالی و اجرایی این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از دکتر مارسلا اسکوراوا (جمهوری چک) برای شناسایی مورفولوژیک گونه و دکتر لیدا فکرت (دانشگاه فردوسی مشهد) به سبب راهنمایی‌های ارزشمندشان قدردانی می‌گردد.

منابع

1- Abe, J., Ganaha-Kikumura, T., & Yukawa, J. (2011). Morphological features, distribution, prey mites, and life history traits of *Feltiella acarisuga* (Vallot)(Diptera: Cecidomyiidae) in Japan. *Applied Entomology and Zoology 46*(2): 271-279. https://doi.org/10.1007/s13355-011-0038-x.

2- Aliabadian, M., Nijman, V., Mahmoudi, A., Naderi, M., Vonk, R., & Vences, M. (2014). ExcaliBAR: a simple and

fast software utility to calculate intra-and interspecific distances from DNA barcodes. *Contributions to Zoology*, *83*(1), 79-84d. https://doi.org/10.1163/18759866-08301004.

3- Armstrong, K., & Ball, S. (2005). DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *360*(1462): 1813-1823. https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1713.

4- Baker, B.P., Green, T.A., & Loker, A.J. (2020). Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. *Biological Control* 140: 104095. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104095.

5- Baker, K. & Cook, R.J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company.

6- Barratt, B.I., Cock, M.J., & Oberprieler, R.G. (2018). Weevils as targets for biological control, and the importance of taxonomy and phylogeny for efficacy and biosafety, *Diversity* 10(3): 73. https://doi.org/10.3390/d10030073.

7- Fedotova, Z. & Kozlova, E. (2019). Gall Midges of the Genus *Feltiella* Rübsaamen (Diptera, Cecidomyiidae) in the Northwest of Russia, with Description of a New Species, *Entomological Review 99*(9): 1359-1381. https://doi.org/10.1134/S0013873819090136.

8- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology 3*(5): 294–299.

9- Gagné, R.J. (1995). Revision of tetranychid (Acarina) mite predators of the genus *Feltiella* (Diptera: Cecidomyiidae), *Annals of the Entomological Society of America 88*(1): 16-30. https://doi.org/10.1093/aesa/88.1.16.

10- Gagné, R.J. & Jaschhof, M. (2021). *A Catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the World*. Fifth Edition. Digital. 816 pp.

11- Ganaha-Kikumura, T., Yukawa, J., Tokuda, M., Ohno, S., & Abe, J. (2012). Occurrence of two acarivorous species of the genus *Feltiella* (Diptera: Cecidomyiidae) in Okinawa, southern Japan, and redescription of *F. acarivora* (Zehntner), *Applied Entomology and Zoology 47*(4): 319-329. https://doi.org/10.1007/s13355-012-0122-x.

12- Gillespie, D.R., Roitberg, B., Basalyga, E., Johnstone, M., Opit, G., Rodgers, J., & Sawyer, N. (1998). Biology and Application of *Feltiella acarisuga* (Vellot)(Diptera: Cecidomyiidae) for Biological Control of Twospotted Spider Mites on Greenhouse Vegetable Crops. Technical Report 145 Agriculture and Agri-Food Canada, Pacific Agri-Food Research Centre: Agassiz, BC, Canada.

13- Harris, K. (1966). Gall midge genera of economic importance (Diptera: Cecidomyiidae) Part 1: Introduction and subfamily Cecidomyiinae; supertribe Cecidomyiidi, *Transactions of the Royal Entomological Society of London 118*(10): 313-358. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1966.tb03156.x.

14- Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., & Young, J.P.W. (1991). *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Germany: Springer.

15- Hoddle, M.S., & Van Driesche, R.G. (2009). Biological control of insect pests. p. 91–100. In: Resh, V.H., Cardé, R.T. (Eds.) *Encyclopedia of Insects*, second ed. Academic Press, San Diego.

16- Honarmand, A., Sadeghi Namaghi, H., & Fekrat, L. (2015). First report of *Feltiella acarisuga* Vallot (Diptera: Cecidomyiidae) in Iran, *Plant Protection 28*(3): 434-436. https://doi.org/10.22067/JPP.V28I3.27134.

17- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution 16*(2): 111-120. https://doi.org/10.1007/BF01731581.

18- Lee, H.-S., Chung, B.-K., & Kim, K.-J. (2004). First report of *Feltiella acarisuga* Vallot (Diptera: Cecidomyiidae) in Korea, *Korean Journal of Applied Entomology 43*(3): 185-188.

19- Muraji, M., Kawasaki, K., Shimizu, T., & Noda, T. (2004). Discrimination among Japanese species of the Orius flower bugs (Heteroptera: Anthocoridae) based on PCR-RFLP of the nuclear and mitochondrial DNAs, *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ 38*(2): 91-95.

20- Opit, G., Roitberg, B., & Gillespie, D. (1997). The functional response and prey preference of *Feltiella acarisuga* (Vallot)(Diptera: Cecidomyiidae) for two of its prey: male and female twospotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychiidae), *The Canadian Entomologist 129*(2): 221-227. https://doi.org/10.4039/Ent129221-2.

21- Rosen, D. (1986). The role of taxonomy in effective biological control programs, *Agriculture, Ecosystems and Environment 15*(2-3): 121-129. https://doi.org/10.1016/0167-8809(86)90085-X.

22- Saxena, A., Mishra, S., Raghuwanshi, R., & Singh, H.B. (2013). Biocontrol agents: Basics to biotechnological applications in sustainable agriculture. p. 141-164. In: Tiwari S.P., Sharma R., Gaur R. (Eds.) *Recent Advances in Microbiology*, Vol 2. Nova Science Publishers Inc., U.S.A.

23- Sayed, S.M., Montaser, M.M., Elsayed, G., Amer, S.A., & Iatrou, K. (2013). Preliminary molecular identification of a predatory bug, *Orius albidipennis*, collected from ornamental plants, *Journal of Insect Science* 13: 11. https://doi.org/10.1673/031.013.1101.

24- Sharaf, N. (1984). Studies on natural enemies of tetranychid mites infesting eggplant in the Jordan Valley, *Journal of Applied Entomology 98*(1-5): 527-533. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1984.tb02745.x.

25- Sharma, A., Diwevidi, V.D., Singh, S., Pawar, K.K., Jerman, M., Singh, L., Singh, S., & Srivastawa, D. (2013). Biological Control and its Important in Agriculture. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*

Research 4(3): 175-180. https://www.ripublication.com/ijbbr_spl/ijbbrv4n3spl_03.pdf.

26- Singh, H. (2006). Achievements in biological control of diseases with antagonistic organisms at National Botanical Research Institute, Lucknow, Current status of biological control of plant diseases using antagonistic organisms in India. Proceedings of the group meeting on antagonistic organisms in plant disease management held at Project Directorate of Biological Control, Bangalore, India on 10-11th July 2003, pp. 329-336. https://eurekamag.com/research/012/763/012763166.php.

27- Skuhravá, M. & Skuhravý, V. (2020). *The Gall Midges of Europe*. Prague: Maxdorf Jesenius.

28- Wardlow, L. & Jobin, A. (1990). Potential new additions to the armoury of natural enemies for protected tomatoes. In *Integrated control in glasshouses, Bulletin SROP* (Vol. 13, Num. 5, pp. 225-227).

29- Watson, G. (1997). The Role of Taxonomy in Biological Control, With Special Reference to Insects. In *Prociding Kongres Perhimpunan Entomologi Indonesia*, Universitas Padjajaran, Bandung (Vol. V, pp. 24-26).